Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Breslau.

Über einen aus Baumwollabfällen isolierten thermophilen Bacillus.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

bei der

Hohen Philosophischen Fakultät der Schlesischen Friedrich Wilhelms-Universität zu Breslau

vorgelegt

von

Hans Surauer.

Promotion: 14. September 1927.

Breslau
Druck von R. Nischkowsky
1928.

Gedruckt mit Genehmigung der Hohen Philosophischen Fakultät
der Schlesischen Friedrich Wilhelms-Universität Breslau.

Referent: Prof. Dr. Peter Stark.

Rigorosum: 27. Juli 1927.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Ueber einen aus Baumwollabfällen isolierten thermophilen Bacillus.

Von **Hans Surauer**, Breslau.

(Eingegangen am 20. August 1927.)

Geschichtlicher Überblick über die thermophilen Bakterien.

Bereits im Jahre 1862 hat F. COHN am Ausfluß des kleinen Karlsbader Sprudels mehrere Arten blaugrüner Algen (Oscillaria) gefunden. Die von ihm bei dieser Gelegenheit gemessene Temperatur betrug 59°. Die Anwesenheit von bei 60° lebenden Algen in den heißen Quellen von Ischia stellte HOPPE-SEYLER (1875) fest. Im Jahre 1879 fand MIQUEL bei seinen Arbeiten im Wasser der Seine ein unbewegliches Bacterium, das erst bei 72° abstarb. MIQUEL schreibt: „Il est curieux de voir un être vivant pulluler dans un milieu liquide, où la main est cruellement brûlée en quelques secondes." Um diese Zeit beobachtete auch VAN TIEGHEM (1881), daß in 74° heißer Bohnenbrühe sich noch Bakterien, ein Kettenkokkus und ein Bacillus, entwickelten, die bei dieser Temperatur auch Sporen bildeten. GLOBIG (1887), der als erster umfangreichere eingehende Forschungen und Untersuchungen über das Vorkommen von Thermophilen angestellt hat, zeigte, daß diese pflanzlichen Lebewesen doch verbreiteter seien, als bis dahin angenommen worden war. Aus Gartenerde konnte er 28 Bakterien- und Pilzarten isolieren, die bei 58° wuchsen. Das von ihm bei einem Teil dieser Bakterien bestimmte Temperaturminimum für das Wachstum lag zwischen 40—50°. In ungereinigten Baumwollabfällen, sogenannte Nisseln, hat F. COHN (1893) gelegentlich der von ihm vorgenommenen umfangreichen Selbsterhitzungsversuche thermophile Mikroorganismen gefunden. MAC FAYDEN und

BLAXALL (1899) fanden bei ihren Arbeiten thermophile Bakterien im Fluß- und Seewasser, menschlichen und tierischen Kot, Staub, Stroh, Dünger, im von der Themse angeschwemmten Schlamm und bis 5 engl. Fuß tief im Boden. „They may almost be termed ubiquitous", schreiben sie. RABINOWITSCH (1895) gelang es bei ihren ausgedehnten Forschungen nach Thermophilen 7 verschiedene Arten festzustellen, und zwar u. a. in frisch gefallenem Schnee, in den Exkrementen von Pferden, Rindern, Ziegen, Hühnern, Tauben, Enten, Papageien, Fischen, Fröschen usw. KARLINSKI (1896) und ebenso TEICH (1896) fanden im Wasser der warmen Schwefelquellen von Jlidze in Bosnien thermophile Bakterien. Als Temperaturmaximum für das Wachstum gibt KARLINSKI 80° für Bacterium Ludwigi und Bacillus Jlidzensis capsulatus an. OPRESCU (1898) wies thermophile Formen im Blutserum, Roquefortkäse und Kanalwasser nach und MICHAELIS (1899) fand solche in Brunnenwasser von verschiedener Herkunft. Im Schaum eines durch Aufwallen eingekochten Sirups stellte LAXA (1898) eine thermophile Art fest. Aus Thermenwasser, Erde und Dünger konnte TSIKLINSKY (1899) thermophile Spaltpilze und Actinomycesarten, darunter auch den Thermomyces lanuginosus, isolieren. Nach ihren Mitteilungen (1903) sind auch im menschlichen Darm Thermophile anzutreffen; 8—10 Stunden nach der Geburt haben sie bereits den Darm besiedelt. SAMES (1900) fand in Erde, Luft, Milch, Jauche, Wasser, Mundschleim thermophile Bakterien, und WEBER (1895) konnte den Nachweis erbringen, daß die Milch immer thermophile Arten enthält, die kräftiges Wachstum entwickeln und eine Veränderung der Milch herbeiführen, wenn dieselbe längere Zeit bei höheren Temperaturgraden gehalten wird. Unter ähnlichen Bedingungen konnte SCHARDINGER (1903) in zubereiteten Speisen Thermophile nachweisen; CATTERINA (1904) isolierte aus Grabenwasser ein auf Agar bei 60° unbewegliches Stäbchen, den Bacillus thermophilus radiatus. Während die in den bisher aufgeführten Arbeiten angegebenen Formen größtenteils ungenau beschrieben und nicht benannt worden sind, hat BLAU (1906) mit den von ihm aus dem Erdboden isolierten Bakterien eingehende Untersuchungen angestellt und sie so genau beschrieben, daß sie jederzeit bestimmt werden können. In seiner Arbeit „Die Selbsterhitzung des Heues" macht MIEHE (1907) mit der Mikroorganismenflora des Heues, insbesondere mit mehreren thermophilen Organismen bekannt, die er aus selbsterhitztem Heu isolieren konnte. Sein Bacillus cal-

factor, dessen untere Wachstumsgrenze bei 30° und dessen Maximum bei 74° liegt, ist befähigt, in Verbindung mit Bacterium coli und Oidium lactis festgepackte Heumassen zu erhitzen. SCHÜTZE (1908) berichtet über thermophile Pilze in selbsterhitztem Kleeheu und DE KRUYFF (1910) über Thermophile, die er in den Tropen aus dem Erdboden isolierte. KROHN VÄINÖ (1923) hat aus einem faustgroßen gefrorenen Klumpen, den er einem Abfallhaufen des botanischen Gartens von Helsingfors entnommen hatte, die von ihm näher beschriebenen thermophilen Arten gezüchtet. In den verschiedenen amerikanischen Arbeiten der letzen Jahre, so von HARDING und WARD (1925), HUNGERFORD und HARDING (1925), COOLEDGE, TANNER und HARDING (1926) wird die bereits von WEBER (1895) gemachte Beobachtung des Vorkommens von thermophilen Bakterien in pasteurisierter Milch bestätigt. Nach LIESKE (1926) fand CHRISTOPH Bakterien, welche sich in heißer Bierwürze vermehren und das Bier trübe machen, und VEILLON streng anaërobe thermophile Bakterien.

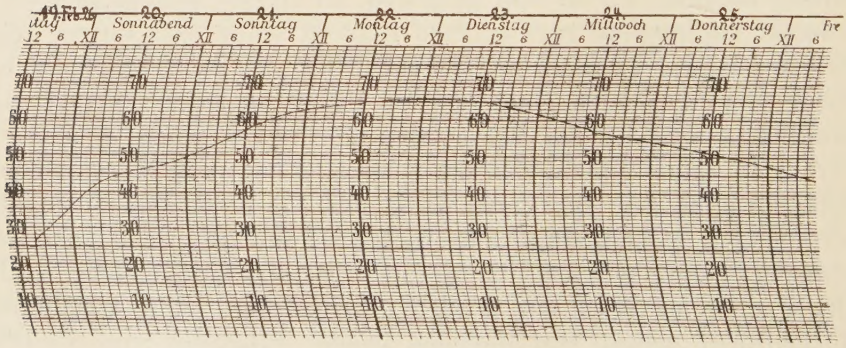
Es gibt wohl kaum einen Ort, an dem nicht thermophile Mikroorganismen gefunden werden, und so konnte auch MOLISCH (1926) während seines zweieinhalbjährigen Aufenthaltes in Japan nicht nur in heißen Quellen bis zu 69° Cyanophyceen und bis zu 77,5° Bakterien finden, sondern auch außerhalb der Thermen thermophile Organismen weit verbreitet feststellen.

Neue Versuche.

Schon einleitend wurde darauf hingewiesen, daß COHN (1891 und 1893) umfangreiche Versuche über Selbsterhitzung von Pflanzenstoffen ausgeführt hat. Neben Gras, feuchtem Heu und angefeuchteter gekeimter Gerste hat er auch Baumwolle, und zwar die Abfälle derselben, sogenannte Nissel, zur Durchführung seiner Arbeit benutzt. Es ist ihm gelungen, zu zeigen, daß in dem von ihm als Thermophor bezeichneten Apparat schon nach kurzer Zeit Selbsterhitzung eintritt, die schließlich bis zu einer Höchsttemperatur von 67,2° sich steigert. Von da ab sank die Temperatur langsam, um nach etwa sechs Tagen die der Umgebung wieder zu erreichen. Zum Beweis, daß die Selbsterhitzung von thermophilen Mikroorganismen verursacht wird, sterilisierte er die Nissel im strömenden Wasserdampf und brachte sie sodann in den Thermophor. Es zeigte sich nicht die geringste Temperaturzunahme. Nach Übergießen der Nissel mit Wasser, in dem frische Baumwollabfälle ausgedrückt waren, trat dagegen wieder Erhitzung ein. COHN

kam zu dem Ergebnis, daß Mikroorganismen die Ursache dieser Erhitzung seien.

In den von mir angestellten Selbsterhitzungsversuchen mit vorgekeimter feuchter Gerste und weiterhin mit stark verunreinigten feuchten Baumwollabfällen wurde möglichst nach den von COHN angegebenen Bedingungen verfahren. Bei den Versuchen mit Gerste wurde insofern abgewichen, als COHN die feuchte Gerste ungekeimt in den Thermophor gebracht hat, während in meinen Versuchen die Gerste erst in den Apparat kam, nachdem die Keimwurzelchen 1—2 cm lang waren. Etwa 2 kg feuchte Gerste wurde in einen runden Korb, der mit Rohnessel ausgespannt war, fest verpackt und in einen großen Korb gebracht, dessen Boden und Seitenwände mit einer Watteschicht als Wärmeisolation versehen waren. Der mit der Gerste beschickte Korb berührte die von einem Drahtnetz umschlossene Wattepackung nicht. Zwischen beiden war ein Abstand von ungefähr 2 cm, so daß sich also zwischen dem eingesetzten Korb und der Isolation ein Luftraum befand. Durch diese Versuchsanstellung wurde einerseits das Abströmen der Wärme verhindert, andererseits aber auch der stark atmenden Gerste ein genügender Luftraum geboten und ein Abfließen der gebildeten Kohlensäure ermöglicht. In die Mitte der eingepackten Gerste wurde der empfindliche Teil eines Thermographen eingesenkt, der die im Innern jeweils herrschende Temperatur aufzeichnete. Dann wurde von oben her mit Watte bedeckt und ein sorgfältiger Abschluß nach außen hergestellt. Ein zweiter Thermograph registrierte die Temperatur der Zimmerluft. Von den vielen Versuchen sei ein besonders gut gelungener herausgegriffen. Die beigefügte Temperaturskala gibt ein zusammenhängendes Bild von dem Verlauf der Selbsterhitzung.



Zunächst sieht man eine völlige Unabhängigkeit der Innentemperatur von der im Zimmer, welch letztere zwischen 20° und 22° schwankte. In der eingepackten Gerste herrschte schon unmittelbar nach dem Ansetzen des Versuches eine Temperatur von 26°, sie stieg dann sehr rasch innerhalb eines Zeitraumes von siebzehn Stunden bis etwa 44,2°, wo die Kurve dann deutlich flacher wird, um nach weiteren elf Stunden zwischen 48 und 49° wieder rascher zu steigen bis auf 66°. Diese Temperatur blieb ungefähr zehn Stunden bestehen und fiel dann langsam und gleichmäßig ab.

Mit Ablauf des Versuches wurde aus dem Innern der eingepackten Gerste mit einer Kornzange möglichst steril Material entnommen, das zum Versuche der Weiterzüchtung in mehrere Kölbchen, in denen verschiedene der üblichen Nährlösungen sich befanden, gegeben wurde. Die Kölbchen wurden in den Brutschrank gebracht und bei einer Temperatur von 45° und 55° gehalten. In keinem der Kölbchen trat eine Trübung der Kulturflüssigkeit ein. Obwohl unter dem Mikroskop die Anwesenheit von Thermomyces lanuginosus und Aspergillus fumigatus festgestellt worden war, gelang es nicht, dieselben weiter zu züchten. Mycel und Sporen waren offenbar durch die hohe Temperatur abgetötet worden. Auch Bakterien gingen nicht an. Diese Beobachtung deckt sich mit der von MIEHE (1907), bei dessen Versuchen sich die Tatsache herausgestellt hat, daß das Innere eines Heuhaufens, der eine genügend lange Zeit auf höherer Temperatur gewesen ist, vollständig steril ist.

Zu den Selbsterhitzungsversuchen mit Baumwollabfällen wurden jedesmal ungefähr 3 kg angefeuchtete Baumwollnissel in einem runden verzinnten Blechzylinder von 25 cm Höhe und 23 cm Durchmesser, dessen Blechwände siebartig durchlöchert sind, fest verpackt. Es war dies der gleiche Apparat, den bereits COHN benutzt hat und der sich noch im Pflanzenphysiologischen Institut vorfand. Den Blechzylinder stellte ich in einen großen Korb und stopfte die Zwischenräume mit gewöhnlicher Watte in ähnlicher Weise wie bei den Versuchen mit Gerste aus, jedoch mit dem kleinen Unterschied, daß zwischen Blechzylinder und Watteisolation der Luftraum geringer war, da ein derartiges Sauerstoffbedürfnis wie bei der lebenden Gerste für das Erhitzungsmaterial in diesem Falle nicht vorlag. In die Mitte des eingepackten Haufens wurde ein Glasthermometer eingesetzt und sodann mit Watte sorgfältig abgeschlossen. Der zur Messung höherer Temperaturen hergestellte und bei den Gerstenversuchen benutzte Thermograph war leider schadhaft ge-

worden und kam daher vorläufig für die Versuche nicht mehr in Frage. Die während der Versuche im Zimmer herrschenden Temperaturen wurden von dem zweiten Thermographen aufgezeichnet. Die folgende Tabelle gibt die Temperaturen.

Zeit				Temperatur Apparat	Zimmer
2. Januar	12	Uhr	mittags	16,5	15,0
3. „	9	„	morgens	39,5	15,5
	3	„		47,2	16,0
	7	„		49,6	15,5
	9	„		50,3	15,5
4. „	9	„	„	49,8	15,1
	3	„		49,0	15,5
	9	„		47,4	16,0
5. „	9	„	„	44,0	15,0
	3	„		42,6	15,7
	7	„		42,0	15,5
6. „	9	„	„	39,5	16,0
	3	„		39,5	16,5
	7	„		39,5	15,5
7. „	9	„	„	40,5	15,5
	3	„		40,9	15,8
	7	„		41,3	15,8
8. „	9	„	„	39,4	15,0
	1	„		38,0	16,0
	7	„		36,9	16,5
9. „	9	„	„	32,7	17,0
10. „	9	„	„	27,2	16,8
11. „	9	„	„	24,5	16,0

Der Verlauf der Selbsterhitzung — einer der günstigsten Versuche sei näher beschrieben — war anfangs ähnlich dem der Versuche mit vorgekeimter Gerste. Sogleich setzte Temperaturerhöhung ein, die sich sehr rasch steigerte, sodaß nach dreißig Stunden bereits eine Temperatur von 50,3 ° erreicht war. Ein weiteres Ansteigen trat bei keinem der zahlreichen Versuche ein. Nachdem die Temperatur sich ungefähr acht bis zehn Stunden auf dem Höhepunkt gehalten hatte, fiel sie langsam und gleichmäßig bis auf 39,5 ° ab, um nach mehrstündigem Verweilen auf dieser Höhe nochmals bis 41,3 ° zu steigen. Dann trat wieder langsames Sinken der Temperatur ein.

Wenn bei den Selbsterhitzungsversuchen mit Baumwollabfällen weder die von COHN mit dem gleichen Material erzielte Höchst-

temperatur noch die in keimender Gerste erreicht worden ist, so müssen hier wohl besondere Gründe vorliegen, und zwar dürfte das aller Wahrscheinlichkeit nach auf das Fehlen oder die mangelhafte Entwicklung derjenigen Organismen zurückzuführen sein, die die Temperatur bis zu dem Minimum des thermophilen Bacillus erhöhen. Im Gerstenversuch liegen die Verhältnisse wesentlich günstiger als in der Baumwolle, da die atmende Gerste an sich schon die Temperatur so hoch steigert, daß sie von vornherein viel bessere Lebensbedingungen für die Thermophilen schafft. Gerste ist außerdem ein bedeutend reicherer Nährboden als die Baumwollabfälle.

Es sei hier noch darauf hingewiesen, daß die Temperatur im Versuch mit kleinen Mengen nur dann zu höheren Graden kommt, wenn sie sehr rasch ansteigt, die Mikroorganismen also sofort eine sehr intensive Tätigkeit entwickeln. Ist der Temperaturanstieg ein allmählicher, so dauert der Ablauf des Versuchs zwar erheblich länger, doch werden hohe Grade dabei nicht erreicht.

Wie auch meine Versuche mit Baumwollabfällen ausfielen, so ändert das nichts an der Tatsache, daß COHN mit demselben Material so hohe Temperaturen (67,2 °) erreicht hat. Auf jeden Fall muß also in den Baumwollabfällen ein thermophiler Bacillus vorhanden sein, der die höchste Temperatur liefert, denn Pilze kommen bei diesen auch hinsichtlich ihrer Sporen schwerlich mehr in Frage.

Um hier Klarheit zu bringen, wurden Versuche angestellt, die zutage führen sollten, ob der Thermophile der Bacillus calfactor ist oder ein anderer noch unbekannter.

Isolierung eines thermophilen Bacillus aus Baumwollabfällen.

a) Rohkultur.

Baumwollabfälle wurden mit kaltem Wasser übergossen und eine Stunde gekocht, um von Anfang an nach Möglichkeit alle Organismen auszuschalten, die nicht thermophil sind. Nach dem Erkalten wurde die Abkochung in ein Erlenmeyerkölbchen filtriert und das klare Filtrat in den Brutschrank gegeben, der auf 58 ° eingestellt worden war. Die Temperatur wurde so hoch gewählt, um Sporen von nicht Thermophilen, die durch das einstündige Kochen nicht abgetötet worden waren, jetzt an der Keimung zu verhindern. Die klare Flüssigkeit war nach 24 Stunden getrübt. Unter dem Mikroskop konnten zahlreiche Stäbchenbakterien, von denen viele endständige Sporen trugen, beobachtet werden. Dieser wäßrige

Auszug wurde als Rohkultur für die weiteren Untersuchungen benutzt.

Da mir die Ernährungsbedingungen der Organismen der Rohkultur noch nicht bekannt waren, so verwendete ich zunächst als Nährboden ein Substrat, das ihnen aller Wahrscheinlichkeit nach zusagen mußte, nämlich ein mit Tierkohle entfärbtes, im Dampftopf an drei aufeinander folgenden Tagen je 30 Minuten sterilisiertes Nisseldekokt. Dasselbe wurde zur Prüfung der Sterilität noch 48 Stunden im Brutschrank belassen. Für feste Nährböden wurde Agar, und zwar der hohen Temperatur wegen 3 g auf 100 ccm Flüssigkeit, beigefügt. Bei Plattenkulturen verfuhr ich in folgender Weise. Die ausgegossenen Platten wurden nach dem Erstarren mit der Deckelseite nach unten in weite Glaszylinder gebracht, deren Boden mit stark verdünnter Kupfersulfatlösung als Desinfektionsmittel bedeckt war und die eine Glasplatte als Deckel hatten. Die Reagenzglaskulturen wurden in hohe Zylinder gestellt, in denen sich mit stark verdünnter Kupfersulfatlösung getränkter Sand befand und die ebenfalls mit Glasplatten abgeschlossen wurden. Durch diese Vorsichtsmaßregeln ist es gelungen, ein Austrocknen der Kulturen zu verhüten.

Die Isolierung für die Reinkulturen gestaltete sich folgendermaßen. Reagenzgläser, in denen sich je 10 ccm Nisseldekoktagar befanden, wurden solange in kochendes Wasser gestellt, bis ihr Inhalt flüssig war, der sodann in sterile Petrischalen ausgegossen wurde. Nach dem Erstarren des Agars wurde mit einem sterilen Glasstab Material von der Rohkultur auf den Agar aufgetragen und mit der Platinnadel sorgfältig ausgestrichen. Für einen Teil der Platten habe ich das sogenannte Verdünnungsverfahren zur Erzielung von Reinkulturen benutzt. Auch hierzu wurde zuerst der Agar in den Röhrchen verflüssigt. In das erste Röhrchen kamen 3 Ösen des Ausgangsmaterials, 3 Ösen des gut durchmischten Inhalts des ersten Röhrchens wurden in das zweite übergeimpft und davon 3 Ösen in ein drittes Röhrchen. Der Inhalt sämtlicher Röhrchen wurde in Petrischalen ausgegossen. Nach dem Erstarren des Agars gelangten sämtliche Platten in den Brutschrank, dessen Innentemperatur 58 ° betrug. Diese Temperatur ist anfänglich aus den bereits angeführten Gründen beibehalten worden. Nach 48 Stunden konnte nur ganz geringes Wachstum festgestellt werden und zwar bei den Strichkulturen, die vereinzelte, winzige, punktförmige Kolonien zeigten. Bei den übrigen Platten war nach zehn Tagen noch kein Wachstum eingetreten, und auch die Kolonien

auf den Strichkulturen hatten sich schlecht weiterentwickelt. Der gewählte Nährboden eignete sich demnach nicht. Meine weiteren Versuche mußten nunmehr dahin gerichtet sein, die für das Wachstum günstigste Nahrung zu ermitteln.

Es wurden Nährlösungen verschiedener Zusammensetzung, wie sie bei den Kulturverfahren üblich sind, hergestellt. Da dem Nisseldekokt, das an sich vielleicht geeignet war, möglicherweise dieser oder jener Stoff fehlen und darum kein Wachstum aufkommen konnte, wurden diesem in getrennten Versuchsreihen als organische Stickstoffquelle Pepton und Asparagin, als anorganische Kaliumnitrat zugesetzt. Für den Kohlenstoffbedarf kamen zu diesen Lösungen noch Traubenzucker, Rohrzucker und Glyzerin hinzu und zwar ebenfalls in besonderen Versuchsreihen. Außer dem Nisseldekokt als Grundsubstanz der Nährlösung kam eine Mineralsalzlösung in Anwendung, die aus 1 g Kaliumbiphosphat, 0,1 g Kalciumchlorid, 0,3 g Magnesiumsulfat, 0,1 g Natriumchlorid, 0,01 g Eisenchlorid gelöst in 1000 g dest. Wasser bestand. Entsprechend dem obigen Verfahren kamen zu dieser Lösung wieder Pepton, Asparagin, Kaliumnitrat, Traubenzucker, Rohrzucker, Glyzerin hinzu. Die klaren Lösungen wurden in sterile Reagenzgläser abgefüllt, an drei aufeinander folgenden Tagen sterilisiert und sodann mit je drei Ösen der Rohkultur geimpft. Nach 24 stündigem Verweilen im Brutschrank wurden die Lösungen auf Wachstum geprüft. Die unter Zusatz von Asparagin und Pepton hergestellten Nährlösungen zeigten geringe Trübung, während der Inhalt aller übrigen Röhrchen vollständig klar geblieben war. Die an den weiteren neun Tagen angestellten Beobachtungen ergaben ein ganz entsprechendes Bild, nämlich leichte Zunahme der schon nach 24 Stunden vorhandenen Trübung ohne Flockenbildung und Niederschlag, Ausbleiben jeglicher Trübung bei den übrigen Nährflüssigkeiten. Somit waren auch mit den angeführten Nährflüssigkeiten noch keine geeigneten Nährböden gefunden, wenigstens waren die erzielten Erfolge unbefriedigend.

Da diese Versuche gezeigt hatten, daß nur die besten Nährböden für das Wachstum der Bakterien günstig waren, während Mineralsalzlösungen mit geringwertigeren Nahrungsquellen völlig versagten, sah ich mich veranlaßt, noch bessere Ernährungsbedingungen zu schaffen. Ich versuchte es nunmehr mit dem in der medizinischen Bakteriologie viel benutzten Fleischwasserpepton. Die Herstellung dieses Nährbodens geschah in der üblichen Weise. Einer einprozentigen wäßrigen Lösung von Liebigs Fleischextrakt

wurden noch ein Prozent Pepton und 0,5 g Natriumchlorid zugesetzt und das Ganze im Dampfstrom bis zur vollständigen Lösung erhitzt. Die Lösung wurde mit gesättigter Natriumkarbonatlösung neutralisiert, sodann eine halbe Stunde im Dampfstrom gehalten. Die nach dem Filtrieren angestellte Prüfung ergab neutrale Reaktion und das Filtrat blieb klar. Die in Röhrchen abgefüllte Nährlösung wurde sodann an drei aufeinander folgenden Tagen je 20 Minuten im Dampftopf sterilisiert. Eine nachträgliche Trübung trat nicht ein.

Mehrere Röhrchen wurden mit je 3 Oesen der Rohkultur geimpft und in den Brutschrank gestellt. Nach siebeneinhalb Stunden ist bereits in allen geimpften Röhrchen Trübung eingetreten, die nach 24 Stunden eine wesentliche Zunahme erkennen läßt. Auf der Oberfläche der Nährlösung sind an einzelnen Stellen sehr dünne, sich berührende Häutchen zu sehen, die bereits bei leichter Bewegung in Form von Schleimfäden sich zu Boden setzen. Eine sogenannte Kahmhautbildung war jedoch im Laufe der Gesamtbeobachtung nicht wahrzunehmen. Das Wachstum war kräftig. Fleischwasserpepton in der obigen Zusammensetzung eignete sich somit sehr gut als Nahrung für die weiteren Versuche. Diese Lösung wird in der Folge kurz als Nährlösung bezeichnet.

b) Reinkultur.

Da bis jetzt lediglich Rohkulturen gezüchtet worden waren, mußte nunmehr zur Züchtung von Reinkulturen übergegangen werden, um die möglicherweise vorhandenen verschiedenen Arten von Organismen zu isolieren. Zur Herstellung dieser Kulturen auf starren Nährböden kam nach dem Ergebnis der Vorversuche Fleischwasserpepton mit einem Zusatz von drei Prozent Agar in Anwendung, eine Zusammensetzung, die künftig kurzweg als Nähragar bezeichnet wird und mit der ein kräftiges Wachstum zu erzielen war. Der im kochenden Wasser geschmolzene Nähragar wurde in Platten ausgegosssen und nach dem Erstarren mit Rohkultur derart geimpft, daß von dem Impfmaterial mit einem sterilen Glasstab auf dem Agar aufgetragen und drei parallele Striche mit der Platinnadel gezogen wurden. Nach 24 stündigem Verweilen der Platten im Brutschrank zeigte es sich, daß zahlreiche kleine Kolonien gewachsen waren, die makroskopisch wie auch mikroskopisch keine Unterschiede zeigten. Von diesem Material wurden nach achttägigem Belassen im Brutschrank vorsichtig mit der Platinnadel vollständig gleich aussehende Kolonien abgenommen

und in steriles destilliertes Wasser gebracht, von dem sich 1 ccm in einem kurzen Reagenzröhrchen befand. Nach einhalbstündigem Erhitzen im kochenden Wasser und sofortigem Abkühlen wurden je 3 Oesen der Flüssigkeit auf Schrägagar übertragen. Dieses Verfahren wurde bei allen weiteren Impfungen genau eingehalten. Geimpft wurden sechs Schrägagarröhrchen. Bei weiteren sechs Agarröhrchen wurden Strichkulturen angelegt, während der Inhalt von sechs nach dem bereits angegebenen Verdünnungsverfahren geimpften Röhrchen zur Herstellung von Plattenkulturen Verwendung fand. Die Temperatur des Brutschrankes wurde jetzt auf 63 bis 64 ° gebracht, da optimales Wachstum bei 58 ° noch nicht zu erzielen war, wie kleine Vorversuche gezeigt haben. Auf dieser Temperatur wurde der Innenraum des Brutschrankes für alle weiteren Versuche gehalten, soweit nicht andere Angaben gemacht werden.

Auf dem Schrägagar sind nach fünfzehn Stunden die Kulturen bereits in kräftiger Entwicklung. Die einzelnen Kolonien sind gelblich-weiß, glänzend mit glattem Rand, jedoch nicht feucht. Ein fest zusammenhängender Belag hat sich nicht gebildet, auch nicht nach vierzehn Tagen; es bleiben immer einzelne rundliche Kolonien, die sich höchstens mit ihren Rändern berühren. Das Kondenswasser ist stark getrübt. Besondere Formmerkmale sind an den einzelnen Kolonien nicht vorhanden.

Bei den Stichkulturen findet Wachstum lediglich auf der Agaroberfläche statt. Dasselbe beginnt im Kreis unmittelbar um den Ausgang des Einstichs herum und verbreitet sich langsam bis an den Rand der Agaroberfläche, während im Stichkanal selbst kein Wachstum eintritt. Auf diese Weise entsteht ein gelblichweißer glänzender Belag. Die Entwicklung der Kultur geht langsamer wie bei den Strichkulturen vor sich.

Auf den geimpften Agarplatten sind nach 24 Stunden zahlreiche kleine, punktförmige Kolonien angegangen. Diese erweisen sich bei der mikroskopischen Beobachtung als zu einer Bakterienart gehörig. Nach 72 Stunden hat das Wachstum bedeutend zugenommen. Neben glänzenden, rundlichen, ganzrandigen oder leicht gebuchteten Kolonien, die dem Agar aufgelagert sind und einen Durchmesser bis 1 mm haben, sind sehr vereinzelt kleine, punktförmige Kolonien zu sehen, die in Agar eingeschlossen sind. Eine Wachstumszunahme der letzteren konnte innerhalb der Beobachtungszeit nicht festgestellt werden.

Unter dem Mikroskop bei schwacher Vergrößerung erscheinen

die Kolonien der Agaroberfläche hellgelb bis bräunlichgelb. Die Färbung nimmt bei den einzelnen Kolonien von außen nach innen zu. Der größte Teil hat glatte Ränder und ist fast kreisrund, während die übrigen wenig gelappte Ausbuchtungen mit leicht gekerbtem Rande besitzen und im Wachstum am weitesten fortgeschritten sind. Die Struktur der Kolonien ist feinkörnig und am äußersten Rande ist ganz feine Streifung zu beobachten. Die im Agar gewachsenen Kolonien zeigen eine dichte Struktur, sie haben kugeligen oder wetzsteinförmigen Bau mit wirr aussehenden Schöpfen (sogenannte Lockenkopfkolonien).

Beide Verfahren, Plattenkulturen wie Strichkulturen, lieferten einheitliche Kolonien, die in ihren Eigenschaften weitgehendste Übereinstimmung zeigten. Demnach war es auch ziemlich sicher, daß nur eine Bakterienart vorlag, was sich dann auch durch die nähere mikroskopische Untersuchung im Entwicklungsgang bei Anwendung des Burri'schen Tuscheverfahrens, worauf weiter unten eingegangen wird, bestätigte.

Entwicklungsgang auf festem und flüssigem Nährboden.

Wie es für jeden Organismus außerordentlich wichtig ist, den Gesamtverlauf seiner Entwicklung zu kennen, so auch für den vorliegenden Fall. Es mußte versucht werden, nicht nur einzelne Stadien der Entwicklung zu beobachten, sondern möglichst den gesamten Verlauf derselben in allen seinen Einzelheiten zu erforschen.

Die Untersuchung erstreckte sich zunächst auf den festen Nährboden, und zwar auf drei Prozent Nähragar. Auf diesem sind nach drei Stunden neben vereinzelten keimenden Sporen Einzel- und Doppelstäbchen vorhanden, daneben viele mehrstäbige (bis neunstäbige) Ketten. Die Stäbchen lassen sich mit Methylenblau-, Karbolfuchsin- und Karbolgentianaviolettlösung gut färben. Stäbchen wie Ketten erscheinen homogen. Nach vier bis fünf Stunden finden sich neben Einzel- und Doppelstäbchen Ketten mit bis sechs Stäbchen. Nach acht Stunden herrschen die Einzel- und Doppelstäbchen vor, mehrstäbige Ketten sind nur noch vereinzelt vorhanden. Bei einzelnen Stäbchen wird leichte Anschwellung an einem Ende wahrgenommen. Nach elf bis zwölf Stunden sind die Einzelstäbchen in der Mehrzahl, während die mehr als zweistäbigen Ketten fast ganz verschwunden sind. Die Zahl der Stäbchen mit endständigen Sporen hat zugenommen. Durch die Sporenanlage sind die Stäbchen an dem einen Ende leicht aufgetrieben, wodurch

sie die Form von Trommelschlägern annehmen. Ganz vereinzelt finden sich auch Stäbchen, bei denen die Spore in der Mitte sitzt, eine Lagerung, durch die das Stäbchen, bauchig aufgetrieben, Spindelform annimmt. Nach zwanzig Stunden haben die Sporen sehr an Zahl zugenommen; die Ketten sind verschwunden und nur noch Einzel- und Doppelstäbchen vorhanden. In den Stäbchen – auch in denjenigen, die Sporen enthalten — ist Glykogen vorhanden, das sich mit verdünnter Jodjodkaliumlösung nachweisen ließ.

Aus dieser Beobachtung geht hervor, daß mit beginnender Sporenbildung die anfänglich entstandenen Ketten in ihre einzelnen Individuen zerfallen.

Für die Untersuchung der Entwicklung in flüssigem Nährboden wurde die in Reagenzgläser gegebene Nährlösung mit je drei Ösen des Sporenmaterials geimpft, das auch Verwendung gefunden hatte bei der Herstellung der Kulturen auf Nähragar. Nach sechs Stunden zeigt sich leichte Trübung im oberen Teil der Nährlösung. Unter dem Mikroskop lassen sich Einzel- und Doppelstäbchen, sowie mehrstäbige Ketten feststellen. Die Stäbchen sind vielfach in lebhafter Bewegung. Nach zehn Stunden hat die Trübung weiter zugenommen, an der Oberfläche der Lösung bilden sich an einzelnen Stellen häutchenartige Verbände. Neben den Einzel- und Doppelstäbchen haben die Ketten — bis zu zehn Stäbchen — zugenommen. An vielen Ketten treten die gegenseitigen Grenzen der einzelnen Bakterien deutlicher hervor, was auf einen Zerfall der Ketten in die Einzelindividuen hinweist und gleichzeitig auch auf Beginn der Sporenbildung. Nach 24 Stunden ist die Lösung stark getrübt, die häutchenartigen Verbände haben sich nicht weiter ausgebreitet. Beim leichten Bewegen der Flüssigkeit sinken schleimige Fäden zu Boden, die sich zusammenballen. Das mikroskopische Bild hat sich kaum verändert, lediglich die Zahl der kettenbildenden Stäbchen ist zurückgegangen Nach acht Tagen ist nur mehr ganz leichte Trübung der Lösung vorhanden mit mäßig starkem, schmutziggrauem Bodensatz. In der Flüssigkeit sind noch Einzel- und Doppelstäbchen mit vereinzelten aus drei bis vier Stäbchen bestehenden Ketten vorhanden. Der Niederschlag enthält Stäbchen mit Sporen und freie Sporen, daneben vereinzelt auch Einzelstäbchen ohne Sporen. An den Sporen befinden sich vielfach Reste von Stäbchen in Gestalt kurzer stielartiger Anhängsel, die sich nur sehr schwach färbten. Sicherlich handelt es sich um die geschrumpften Membranreste (Abb. 1).

War im Vorhergehenden der Entwicklungsgang des Bacillus im flüssigen Nährboden unter Benutzung von reichlichem, Sporen

Abb. 1. Bakterien aus Nährlösung bei 63—64 Grad, 24 Stunden nach Überimpfung. Vergr. 2000.

enthaltendem Material beschrieben worden, so wurde nunmehr seine Entwicklung in Nährflüssigkeit, von einer Spore ausgehend einer eingehenden Beobachtung unterzogen.

Zu diesem Zwecke kam das Burri'sche Tuscheverfahren in Anwendung.

Von der Oberfläche der im Verhältnis 1: 10 mit Wasser verdünnten, sterilisierten flüssigen Tusche wurden nach vierzehn Tage langem Absetzen mit einer sterilen Platinöse 5 Tropfen Tusche herausgenommen und auf einen entfetteten, sterilen Objektträger nebeneinander gegeben. Eine geringe Menge Sporenmaterials von einer 1Woche alten Agarkultur wurde sodann mit einer kleinen Öse im ersten Tropfen verrieben. Dann wurde eine kleine Öse dieses verriebenen Materials in den zweiten Tuschetropfen übertragen, verrieben und in der gleichen Weise verdünnt bis zum fünften Tropfen. Aus letzterem wurden mit einer sterilisierten Zeichenfeder möglichst kleine Punkte reihenweise auf eine sterile Platte Nähragar gebracht und einzeln mit sterilen Deckgläschen bedeckt. Die Punkte wurden sodann unter dem Mikroskop beobachtet. Von den bezeichneten Punkten, die nur eine einzige Spore aufwiesen, wurde das Deckgläschen mit einer sterilen Pinzette abgehoben und in ein kleines Reagenzröhrchen gebracht, in dem sich 1—2 ccm

sterile Nährflüssigkeit befanden. Auf diese Weise wurden mehrere Kulturen angestellt.

Nach zwei Stunden ist bereits Teilung des aus der Spore ausgetretenen lebhaft beweglichen Stäbchens eingetreten. Einzel- und Doppelstäbchen sind vorhanden. Bei Beobachtung nach drei, vier und fünf Stunden finden sich in der Nährlösung neben Einzel- und Doppelstäbchen mehrstäbige Ketten. Die Stäbchen sind in lebhafter Bewegung. Die gegenseitigen Grenzen der einzelnen Bakterien lassen einen Zerfall der Ketten in die Einzelindividuen deutlich erkennen. Nach sieben Stunden ist leichte Trübung der bis dahin klaren Nährflüssigkeit eingetreten, die im Verlauf der nächsten Stunden immer mehr zunimmt. Das mikroskopische Bild hat sich kaum wesentlich geändert, lediglich die Zahl der mehrstäbigen Ketten hat zugenommen. Nach neun Stunden ist weitere leichte Zunahme der Trübung festzustellen. Im mikroskopischen Bild ist keine auffallende weitere Veränderung zu beobachten. Nach zwölf Stunden ist die Trübung der Nährlösung stark; an der Oberfläche der Lösung haben sich schleimige Verbände angesammelt, die jedoch bei ganz leichter Bewegung in Form von dicken Schleimfäden zu Boden sinken. Die Zahl der mehrstäbigen Ketten hat sich bedeutend vermehrt. Nach sechzehn Stunden ist beginnende Sporenbildung festzustellen, die Stäbchen sind vielfach leicht an einem Ende aufgetrieben, ganz vereinzelt finden sich auch Stäbchen, die mehr gegen die Mitte zu Anschwellung aufweisen. An einzelnen Stäbchen finden sich auch bereits fertig gebildete Sporen. Nach 24 Stunden ist reichliche Sporenbildung eingetreten. Neben Stäbchen mit endständigen Sporen, Trommelschlägerform, und Stäbchen mit zentral gelagerten Sporen, die jedoch sehr selten auftreten, finden sich auch freie Sporen, mit den Resten des Stäbchens an einem Ende.

Die eben gegebene Gegenüberstellung zeigt, wie die Entwicklung auf festem und flüssigem Nährboden annähernd dieselbe ist. Daß die Entstehung kettenförmiger Bakterienverbände auf flüssigem Boden leichter vor sich geht wie auf festem, ist nicht weiter verwunderlich. Die Sporenkeimung, die bei diesen Beobachtungen natürlich auch untersucht werden mußte, wird in einem besonderen Abschnitt geschildert werden.

Gestalt und Größe der Bakterien.

Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt worden ist, lassen sich die Stäbchen mit den bekannten Farbstofflösungen leicht

färben. Die an gefärbten und ungefärbten Präparaten mit dem Stufenmikrometer vorgenommenen Messungen der Stäbchen ergaben eine durchschnittliche Länge von 2—4 μ und eine Breite von 0,3—0,4 μ im Durchschnitt. Wesentliche Unterschiede in den Größenverhältnissen konnten bei den Stäbchen, ob sie bei Temperaturen nahe dem Minimum oder Maximum des Wachstums — darüber später — gezüchtet worden waren, nicht festgestellt werden. Auch das verschiedene Alter ließ keine besonderen Größenunterschiede der einzelnen Stäbchen erkennen.

Im Einklang mit der Beobachtung, daß die Stäbchen Eigenbewegung besitzen, hat die mikroskopische Untersuchung das Vorhandensein von Bewegungsorganen ergeben. Die Stäbchen sind mit sehr zarten, langen Geißeln versehen, die sich an den Längsseiten befinden, sie sind also peritrich. Die Zahl der Geißeln an jeder Seite scheint nicht groß zu sein. Im gefärbten Präparat sind sie selten einzeln zu sehen, fast immer waren sie zu Zöpfen verflochten. Diese Beobachtungen waren infolge der geringen Größe der Bakterien und der Zartheit der Geißeln mit einigen Schwierigkeiten verknüpft (Abb. 2).

Abb. 2. Wie Abb. 1, jedoch 5 Stunden nach Überimpfung.
Die Bakterien sind infolge der Beizung für die Geißelfärbung stark gequollen.

Zur Geißelfärbung wurde die Löffler'sche Beize (4 g Gerbsäure gelöst in 16 ccm dest. Wasser, 10 ccm kalt gesättigte Ferrosulfatlösung und 2 ccm kalt gesättigte alkoholische [96 %] Fuchsinlösung) benutzt. Da mit der Möglichkeit gerechnet werden mußte, daß die Bakterien ihre Geißeln bei Abkühlung sofort abwerfen, wurde das ganze Färbeverfahren in der Wärme durchgeführt. Von

gut schwärmendem, zwölf Stunden altem Bakterienmaterial brachte ich ganz wenig auf mehrere vollständig fettfreie Deckgläschen und strich das Material mit je einem sehr kleinen Tropfen Brunnenwasser möglichst rasch aus. Die Deckgläschen hielt ich während dieser Zeit warm und brachte sie nach Fertigstellung des Ausstrichs sogleich in den Brutschrank, wo ich sie zehn Minuten trocknen ließ und dadurch gleichzeitig die Bakterien fixierte. Eine Fixage durch Ziehen der Deckgläschen durch die Flamme wurde nicht vorgenommen. Nach dem Antrocknen ließ ich filtrierte Beize fünf Minuten ohne Erwärmen einwirken und spülte sie dann mit dem Wasserstrahl kräftig ab. Nach dem Absaugen des Wassers wurde mit der Ziehl-Neelsen'schen Karbolfuchsinlösung zwei Minuten gefärbt unter leichtem Erwärmen bis zur beginnenden Dampfbildung. Nach diesem Verfahren ist die Färbung der Geißeln gut gelungen.

Verhalten der Gram'schen Färbung gegenüber.

Die Bakterien erwiesen sich als gramnegativ, sie wurden im Alkohol entfärbt. Die Färbung wurde an Bakterienmaterial verschiedenen Alters vorgenommen, das auf Objektträger ausgestrichen und fixiert wurde. Nach der Fixierung wurden die Präparate zwei Minuten mit Karbolgentianaviolettlösung bis zur schwachen Dampfentwicklung erwärmt, nach dem Abgießen der Farblösung zwei Minuten mit Jodjodkaliumlösung behandelt und sodann mit 96-prozentigem Alkohol entfärbt. Die entfärbten Präparate wurden mit 1:10 verdünnter Karbolfuchsinlösung nachgefärbt.

Säurefestigkeit.

Zur Prüfung der Säurefestigkeit der Bakterien wurde ebenfalls Material verschiedenen Alters verwendet. Von zwölf Stunden bis zu drei Wochen alten Agarkulturen wurden auf Deckgläschen Ausstriche gefertigt und fixiert. Die Präparate wurden in Karbolfuchsinlösung gebracht, die bis zum leichten Aufkochen erhitzt worden war, und drei Minuten in dieser Lösung belassen. Sodann wurden die Deckgläschen fünfzehn Sekunden in fünfprozentige Schwefelsäure, dreißig Sekunden in siebzigprozentigen Alkohol eingetaucht und zuletzt mit Wasser abgespült und in Wasser untersucht. Die Bakterien wurden durch die verdünnte Schwefelsäure vollständig entfärbt, sie sind nicht säurefest.

Gestalt und Größe der Sporen.

Die Sporen sind fast alle länglich eiförmig, vereinzelte mehr kugelig. Sie sind durchschnittlich 1,1—1,2 μ lang und 0,7—0,8 μ breit, gemessen mit dem bereits erwähnten Stufenmikrometer am ungefärbten und gefärbten Material.

Zur Sporenfärbung dienten folgende Methoden, die ein gutes Ergebnis lieferten im Gegensatz zu verschiedenen in der Literatur angegebenen, die meist keinen befriedigenden Erfolg brachten, vielfach auch zu umständlich in der Ausführung waren. Die fixierten Präparate wurden fünf Minuten lang mit fünfprozentiger wäßriger Chromsäurelösung behandelt, mit Wasser gründlich abgespült, unter leichtem Aufkochen drei Minuten mit Karbolfuchsinlösung behandelt, eine viertel Minute mit dreiprozentigem Salzsäure-Alkohol entfärbt, im Wasser abgespült, mit wäßriger Methylenblaulösung unter leichtem Erwärmen eine halbe Minute behandelt und sodann gründlich in Wasser abgespült. Bewährt hat sich auch das von WALDMANN (Ref. in Zeitschr. f. wissensch. Mikr. 29, 1902, S. 127) vorgeschlagene Verfahren: Auf die fixierten Präparate läßt man zwei Minuten lang Methylenblaulösung, bestehend aus 1 ccm zweiprozentiger wäßriger Methylenblaulösung, 9 ccm dest. Wassers und fünf Tropfen 0,5-prozentiger wäßriger Kalilauge, unter ständigem Erwärmen einwirken. Nach gründlichem Abspülen mit Wasser wird ganz kurz mit verdünnter Karbolfuchsinlösung nachgefärbt. Die Sporen heben sich leuchtend blau von den roten Bakterienleibern ab.

Sporenkeimung.

Bei 63° bis 65° erfolgte die Keimung der Sporen nach einviertel bis anderthalb Stunden unter leichtem Anschwellen derselben. Nachdem das Präparat jeweils fünf Minuten auf dem Objekttisch war, begann mit der Beobachtung gleichzeitig die Zeitmessung. Das Stäbchen tritt an einem Ende der Spore durch Aufreißen der Haut ruckartig aus, die Keimung ist also eine polare. Die leere Sporenhülle haftet noch kurze Zeit am Stäbchen, das bereits lebhafte Eigenbewegung ausweist (Abb. 3).

Die Beobachtung der Sporenkeimung erfolgte im hängenden Tropfen unter Benutzung eines heizbaren Objekttisches, dessen Temperatur während der gesamten Beobachtungszeit auf 63—65° gehalten wurde. Reichliches, Sporen enthaltendes, acht Tage altes Material wurde in 1 ccm dest. sterilisiertes Wasser gebracht und eine halbe Stunde im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Ab-

kühlen wurden 2 Ösen des Materials auf einem durch trockene Hitze sterilisierten Deckgläschen ausgestrichen, angetrocknet und

Abb. 3. Wie Abb. 1, jedoch zwei Stunden nach Überimpfung. Vergr. 2000.

ein Tropfen flüssig gemachten 0,5-prozentigen Nähragars darauf gegeben. Die Abdichtung des Deckgläschens auf dem Objektträger erfolgte mit Kanadabalsam.

Sporentötungsversuche in kochendem Wasser.

Die bisherigen Beobachtungen ließen bereits die Vermutung aufkommen, daß die Sporen recht widerstandsfähig sein müssen, und die Ergebnisse der Sporentötungsversuche bestätigten dies vollauf, denn die Tötungszeit für die Sporen in kochendem Wasser konnte zwischen 24 und 25 Stunden festgestellt werden.

Zur Bestimmung dieser Zeit brachte ich reichliches Sporenmaterial von drei Wochen alten Agarkulturen in 10 cm hohe Röhrchen mit 1,8 cm lichtem Durchmesser, in denen sich je 1 ccm dest. sterilisiertes Wasser befand. Die Röhrchen wurden mit sterilen Wattepfropfen verschlossen und mit einer zweifachen Lage von Blattzinn fest überspannt. Als Erhitzungsgefäß benutzte ich ein mit einem Deckel verschließbares Wasserbad mit Zu- und Abfluß, in dessen Deckel Löcher angebracht waren, die es ermöglichten, die einzelnen Röhrchen tief ins kochende Wasser einzuführen. Ein eingesetztes Thermometer diente zur Kontrolle der Temperatur des

Wasserbades. Die Röhrchen wurden mit beginnendem gleichmäßigen Kochen des Wassers eingesteckt und die Löcher sorgfältig mit Watte abgedichtet.

Nach achtstündigem Kochen wurden erstmalig einem Röhrchen mehrere Ösen Material entnommen und auf je zwei Schrägagarröhrchen gebracht. Die geimpften Agarröhrchen gelangten sofort in den Brutschrank. Zunächst wurde von zwei zu zwei Stunden dieses Verfahren wiederholt und mit Ablauf von 26 Stunden der Versuch beendet. In allen Röhrchen mit Ausnahme von zweien war nach 72 Stunden Wachstum eingetreten. Nach zehn Tagen wiesen diese beiden Röhrchen gleichfalls noch kein Wachstum auf, ebenso nach zwanzig Tagen. Diese Röhrchen waren geimpft mit dem 26 Stunden gekochten Material.

Im zweiten Versuch wurden die Abimpfungen unter Berücksichtigung des ersten Ergebnisses nach 20, 21, 22, 23, 24, 25 und 26-stündigem Verweilen im kochenden Wasserbad vorgenommen. Wachstum nach 72 Stunden war in allen Röhrchen eingetreten mit Ausnahme derjenigen, die mit 25 und 26 Stunden lang gekochtem Material beschickt waren.

In einem dritten Versuch wurde abgeimpft aus Material, das 23, 24, 25 und 26 Stunden gekocht worden war. Wachstum war nach 72 Stunden eingetreten in den Röhrchen, die mit Material geimpft waren, das einer 23- und 24-stündigen Kochdauer ausgesetzt war. In den übrigen Röhrchen war auch nach zwanzig Tagen kein Wachstum festzustellen. In diesen drei Reihen wurden genauestens alle Versuchsbedingungen, wie sonst üblich, eingehalten und nur drei Wochen altes Ausgangsmaterial verwendet.

Im Autoklaven bei 120 ° (1 Atm. Druck) sind die Sporen nach zwanzig Minuten abgetötet.

Auch zu diesem Versuch nahm ich drei Wochen altes Ausgangsmaterial von Schrägagarkulturen. Mehrmals wiederholte Impfungen auf Schrägagar brachten dasselbe Ergebnis: in keinem der geimpften Röhrchen war Wachstum eingetreten.

Verhalten der Bakterien gegenüber der Temperatur.

Es wurde bereits erwähnt, daß die Stäbchen eine lebhafte Beweglichkeit zeigen, die unter der Sporenbildung in keiner Weise leidet. Das Verhalten der Stäbchen gegenüber Temperaturen verschiedener Höhe wurde hinsichtlich der Beweglichkeit einer eingehenden Beobachtung unterzogen, und zwar im hängenden Tropfen unter Benutzung des heizbaren Objekttisches mit Thermo-

meter. Zur Herbeiführung eines dichten Abschlusses von Deckgläschen und hohlgeschliffenem Objektträger wurde zunächst weiße Vaseline benutzt, doch bei der ersten Beobachtung stellte es sich schon heraus, daß Vaseline sich nicht eignet, da es bei längerer Einwirkung von höheren Temperaturen abschmilzt und nicht mehr vollständig abdichtet. Das Eintrocknen des Präparats ist die unausbleibliche Folge. Dagegen hat sich Kanadabalsam als brauchbares Dichtungsmittel erwiesen und ist daher für sämtliche Versuche im hängenden Tropfen verwendet worden. Als Beobachtungsmaterial habe ich junge Kulturen von Schrägagar mit sehr lebhaft beweglichen Stäbchen benutzt und davon sowohl in physiologische Kochsalzlösung wie auch in Nährlösung eingetragen. Die verschiedene Zusammensetzung des Mediums hatte auf die Beweglichkeit keinen Einfluß.

Nachdem die Temperatur zehn Minuten auf 30° gehalten worden war, um einen Ausgleich von Strömungen im Tropfen zu erreichen, begann die Beobachtung. Es sind zahlreiche Einzel- und Doppelstäbchen mit lebhafter Bewegung vorhanden. Bei fortschreitender Temperaturerhöhung ist eine Zunahme der Beweglichkeit wahrzunehmen. Die meisten Stäbchen finden sich etwas vom Rande des Tropfens entfernt nach der Mitte desselben liegend. Bei 65° ist die Bewegung sehr lebhaft, die Bakterien schießen vorwärts und rückwärts oder führen rasche Kreiselbewegungen aus, welche sich dann in eine geradlinige Fortbewegung umwandeln, indem die Bakterien ruckweise mit außerordentlicher Geschwindigkeit fortschießen. An einzelnen Stellen, wo Stäbchen gehäuft liegen, ist ein scheinbarer Stillstand der Bewegung eingetreten, bis unvermittelt aus dem Verbande sich Stäbchen loslösen und hin und her schießen. Bei weiterem Ansteigen der Temperatur tritt kein Stillstand ein. In einem Falle wurde bis auf 90° erwärmt, ohne daß die Stäbchen die Bewegung aussetzten. Bei weiteren Versuchen war noch starke Beweglichkeit bei 92° festzustellen, auch nach zehn Minuten langem Belassen bei dieser Temperatur. Aus meinen sonstigen Beobachtungen muß ich schließen, daß Stäbchen, selbst kurze Zeit auf 100° erhitzt, nicht ihre Beweglichkeit einbüßen. Mit Rücksicht auf die Linsen des Objektivs, für die durch hohe Wärmegrade Schädigung zu befürchten war, wurde eine weitere Steigerung der Temperatur vermieden. Von 92° brachte ich die Präparate auf Zimmertemperatur von 21° und beobachtete bei dieser Temperatur. Nach zwei Stunden war noch kein Stillstand in der Bewegung eingetreten, lediglich die Zahl der ruhenden Indivi-

duen hat zugenommen und die Schnelligkeit der Bewegung abgenommen. Nach dreistündigem Verweilen bei 21° beobachtete ich wieder bei 65°. Auf diese Temperatur war bereits vor Verbringen des Hängetropfenpräparats auf den Objekttisch dieser eingestellt worden. Die Bewegung war nicht zum Stillstand gekommen. Nun wurden die Präparate unter dem Strahl der Wasserleitung auf 12° abgekühlt und bei dieser Temperatur eine Stunde belassen. Bei 60° sodann beobachtet, konnte keine Schädigung der Stäbchen festgestellt werden. Zwar erwiesen sich die Bakterien anfänglich etwas träge, aber schon nach wenigen Minuten war die Beweglichkeit sehr lebhaft.

Mehrere Hängetropfenpräparate wurden 24 Stunden bei 45° gehalten und nach dieser Zeit bei 60° untersucht. Am Rande des Tropfens haben sich nunmehr vereinzelt Stäbchen angesammelt, die spindelförmig aufgetrieben sind. Nach der Mitte des Tropfens hin nimmt dagegen die Zahl der endständig angeschwollenen Stäbchen zu, der größte Teil der in der Mitte des Tropfens lagernden Stäbchen ist nicht aufgetrieben, also sporenlos. Vielfach liegen die Stäbchen nicht in der ursprünglich mehr oder weniger geradlinigen Anordnung, sondern winkelig zu einander. Die Sporen heben sich, wo vorhanden, deutlich ab. Die Stäbchen sind lebhaft beweglich. Das Sauerstoffbedürfnis ist anscheinend groß, wenigstens läßt die massenhafte Ansammlung der Bakterien am Rande des Tropfens und in dessen Nähe darauf schließen.

Unter den Bakterien sind die Ansprüche an die Temperatur sehr verschieden, und so läßt sich das Wärmebedürfnis als typisches Merkmal für die einzelnen Bakterienarten heranziehen. Mehrfach ist der Versuch einer Unterbringung der Bakterien in biologische Gruppen nach ihren Temperaturansprüchen gemacht worden, doch ist allen diesen Einteilungen eigen, daß die Grenzen zwischen den einzelnen Gruppen keine scharfen sind. Im vorliegenden Falle konnte indessen kein Zweifel darüber bestehen, daß es sich um einen extrem thermophilen Bacillus handelt, wenigstens geht das aus allen bisher angeführten Beobachtungen hervor.

Nunmehr war es die Aufgabe, die Kardinalpunkte, Minimum, Optimum und Maximum, für den Bacillus festzustellen. Für die Bestimmung des Minimums und Maximums diente die Entstehung eines Belags auf Schrägagar. Dieser hatte dieselbe Zusammensetzung, wie sie für die früheren Versuche bereits angegeben worden ist. Bei der Bestimmung des Optimums wurde die Zeit von der Impfung bis zum Entstehen eines Belags als Maßstab ge-

nommen. Als Impfmaterial habe ich für sämtliche Versuche das gleiche Sporenmaterial von vier Wochen alten Agarkulturen abgenommen, das, in sterilisiertes dest. Wasser gebracht, eine halbe Stunde in kochendem Wasserbad belassen und von dem nach sofortiger Abkühlung je 3 Ösen auf Schrägagar abgestrichen wurden. Die Agarröhrchen kamen dann in den Brutschrank.

Temperaturminimum.

Temperatur 30 °: Nach 24 Stunden kein Belag, ebenso nach 48,72 und 96 Stunden und 10 Tagen. Eine erneute Impfung hatte dieselben Ergebnisse, kein Belag nach weiteren 10 Tagen.
„ 35 °: Gleiches Verhalten.
„ 40 °: „ „
„ 45 °: „ „
„ 50 °: „ „
„ 55 °: Nach 24 Stunden bereits kräftiger Belag.

Nach diesem Ergebnis wurden nunmehr die Temperaturgrenzen für die Beobachtung enger gezogen.

Temperatur 52 °: Nach 24 Stunden Belag vorhanden.
„ 50 °: Ergebnis wie beim früheren Versuch, kein Belag, auch nicht nach 10 Tagen.

Die untere Temperaturgrenze für das Wachstum des Bacillus liegt somit zwischen 50 und 52 °. Mit Rücksicht darauf, daß für diese das Minimum betreffenden Versuche nur ein kleiner gasheizbarer Brutschrank zur Verfügung stand, dessen Temperatur sich nicht mit genügender Sicherheit in engen Grenzen konstant halten ließ, habe ich die untere Grenze weiter (50—52 °) gelassen, um nicht durch etwaige Fehler des Apparats in Irrtümer zu verfallen.

Temperaturmaximum.

Temperatur 80 °: Nach 24, 48, 72, 96 Stunden und 10 Tagen kein Belag. Die erneute Impfung hatte dieselben Ergebnisse, nach weiteren 10 Tagen kein Belag.
„ 78 °: Gleiches Verhalten.
„ 76 °: „ „
„ 74 °: Nach 24 Stunden Belag vorhanden.
„ 75 °: Nach 24, 48, 72, 96 Stunden und 10 Tagen kein Belag. Die erneute Impfung hatte dieselben Ergebnisse, nach weiteren 10 Tagen kein Belag.

Das Maximum der Temperatur liegt für den Bacillus bei 74 °. Diese obere Grenze wird vom Bacillus anscheinend längere Zeit ohne Schädigung ertragen, doch teilt er sich nicht mehr. Von Kulturen, die fünf Tage bei 74 ° gehalten worden waren, wurde auf

Schrägagar übergeimpft. Nach 24 Stunden bei 70 ° konnte kräftiger Belag festgestellt werden. Sporenbildung findet bei 74 ° noch statt, wie die mikroskopische Untersuchung des Belags zeigte.

Temperaturoptimum.

Temperatur	58 °:	Belag	nach	8	Stunden	wahrnehmbar.
„	60 °:	„	„	8	„	„
„	62 °:	„	„	6	„	„
„	64 °:	„	„	5—6	Stunden	wahrnehmbar
„	66 °:	„	„	$4—4^1/_2$	„	„
„	68 °:	„	„	$3—3^1/_2$	„	„
„	70 °:	„	„	$4—4^1/_2$	„	„

Das Temperaturoptimum des Bacillus dürfte nach diesem Ergebnis um 68 ° liegen.

Verhalten der Bakterien gegenüber dem Sauerstoff.

Die oben geschilderte Beobachtung im hängenden Tropfen und an der Stichkultur auf festem Nährboden weist darauf hin, daß der Bacillus stark sauerstoffbedürftig ist, denn es trat immer nur Wachstum ein, wo ungehinderter Sauerstoffzutritt war. Dafür spricht auch das Verhalten der bei dem Verdünnungsverfahren in der Tiefe des Agars gelagerten Kolonien, die sich nur bis zu geringer Größe entwickelten und keineswegs so gut gediehen, wie die auf der Oberfläche. Ferner sind hier zu erwähnen die flüssigen Nährboden, bei denen die Trübung ausnahmslos zuerst in den oberen Schichten eintritt. Auch sei hingewiesen auf das Verhalten im Gasrohrchen, wo sich gutes Wachstum nur im offenen Schenkel findet, wie weiter unten gezeigt wird.

Im folgenden seien die eingehenden Versuche über das Sauerstoffbedürfnis beschrieben.

Drei Wochen altes Kulturmaterial und solches von 24 Stunden alten Agarkulturen wurde in Schrägagar und Nährlösung übergeimpft, und zwar für Lösung und Agar je in mehrere Röhrchen. Die geimpften Röhrchen, die Watteverschluß hatten, wurden in starkwandige, etwa 20 cm hohe Kulturgefäße mit lichtem Durchmesser von ungefähr 3 cm gebracht, in welchen sich alkalische Pyrogallollösung, bestehend aus gleichen Teilen zwanzigprozentiger wäßriger Lösung von Pyrogallol und zwanzigprozentiger wäßriger Kalilauge befand. Die Gefäße erhielten einen Verschluß durch kräftige, neue Kautschukstopfen und wurden außerdem noch mit Siegellack sorgfältig abgedichtet. Zur Kontrolle wurden zweifach Röhrchen mit Nährlösung und Agar unter Zusatz von

je zwei Tropfen 0,1-prozentiger wäßriger Methylenblaulösung angestellt. Diese Röhrchen blieben ungeimpft, wurden aber auch in Kulturgefäße mit alkalischer Pyrogallollösung gebracht und ebenso sorgfältig verschlossen. Weitere Röhrchen mit Nährlösung und Nähragar wurden mit demselben Ausgangsmaterial geimpft, jedoch dem Sauerstoff der Zutritt nicht versperrt. Sämtliche Röhrchen kamen in den Brutschrank.

Das Ergebnis stellt sich folgenderweise dar: Nach 24 Stunden: Nährlösung und Nähragar mit Methylenblauzusatz sind vollständig entfärbt, was die völlige Absorption des Sauerstoffes erweist. In Nährlösung und auf Agar mit ungehindertem Sauerstoffzutritt ist Wachstum eingetreten, und zwar wird in der Lösung Trübung festgestellt, auf Agar sind zahlreiche Kolonien angegangen; das Kondenswasser ist leicht getrübt. Dagegen wurde in den unter anaëroben Bedingungen gehaltenen Röhrchen kein Wachstum beobachtet.

Nach 48 Stunden: Die unter Sauerstoffausschluß gehaltenen Röhrchen zeigen keine Veränderung; die Nährlösung ist vollständig klar, auch auf Agar ist kein Wachstum eingetreten.

Nach 52 Stunden: Wachstum ist bei anaërober Züchtung weder in der Nährlösung noch auf dem Nähragar eingetreten.

Nach 10 Tagen: Weder in Nährlösung noch auf dem Nähragar ist bei den unter Sauerstoffentzug gehaltenen Röhrchen Wachstum eingetreten. Bei den Röhrchen mit Sauerstoffzutritt ist die bereits nach 24 Stunden beobachteteWachstumsentwicklung fortgeschritten sowohl in der Nährlösung, wie auch auf dem Agar.

Jetzt wurde von den anaëroben Kulturen der Verschluß entfernt und sie weiter im Brutschrank gehalten. Wachstum ist nunmehr bei Sauerstoffzutritt nach 24 Stunden in den Nährlösungen und auf dem Nähragar festzustellen.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß bei Sauerstoffabschluß kein Wachstum der Bakterien eintritt, somit der Bacillus aërophil ist. Sie haben aber auch nicht durch den Sauerstoffmangel gelitten, wenigstens nicht bei zehntägigem Ausschluß desselben, wie der eben beschriebene Versuch deutlich zeigt. Wahrscheinlich sind es die Sporen, die diese ungünstige Vegetationsperiode überdauern.

Versuche über den Stoffwechsel.

a) Ernährungsversuche.

Als Nährboden für Bakterien finden allgemein auch sterilisierte Reservestofforgane der Pflanzen, so die Kartoffel, die Möhre, die

Zuckerrübe u. a. häufige Verwendung; dadurch gelingt es vielfach Bakterienkolonien auch unter etwas natürlicheren Bedingungen zu beobachten. Von diesen pflanzlichen Nährstoffen wurde von mir das Verhalten des Bacillus gegenüber der Kartoffel und der Möhre eingehend geprüft.

Ein Teil der geschälten und gut gereinigten Kartoffeln wurde in Scheiben geschnitten und in Petrischalen ausgelegt. Von dem Rest wurden etwa 5 cm lange zylindrische Stücke ausgestochen, diese diagonal durchgeschnitten und die so entstandenen Hälften in Reagenzgläser gebracht. In den Ragenzgläsern befanden sich etwa 2 ccm Wasser und je ein etwa 3 cm langes Glasstäbchen, das ein Gleiten der Kartoffelstücke in das Wasser verhinderte. Die Kartoffeln wurden an drei aufeinander folgenden Tagen zwanzig Minuten sterilisiert, nachdem vorher noch ein Teil derselben mit $n/_{10}$ Natriumkarbonatlösung schwach alkalisch gemacht worden war. Je drei Ösen des Ausgangsmaterials wurden auf den Kartoffeln abgestrichen und dieselben in den Brutschrank gestellt.

Nach 24 Stunden: Wachstum ist nicht eingetreten.
„ 48 „ „ „ „ „
„ 7 Tagen „ „ „ „

Da es sich zeigte, daß die in den Petrischalen befindlichen Kartoffelscheiben trotz aller getroffenen Vorkehrungen stark ausgetrocknet waren, wurden diese für die weiteren Beobachtungen ausgeschaltet. Die in den Reagenzgläsern untergebrachten Kartoffeln wurden erneut geimpft.

Nach 24 Stunden: Wachstum ist nicht eingetreten.
„ 48 „ „ „ „ „
„ 7 Tagen „ „ „ „

Eine dritte Impfung verlief ebenfalls negativ. Auf der Kartoffel versagt der Bacillus also vollständig, es tritt weder bei neutraler noch bei schwach alkalischer Reaktion Wachstum ein.

Zur Kultur des Bacillus auf Möhren wurden von den geschälten und gründlich gereinigten Möhren ebenfalls 5 cm lange zylindrische Stücke ausgestochen, diagonal durchgeschnitten und in Reagenzgläsern untergebracht. Im übrigen wurde genau wie bei den Kulturversuchen mit der Kartoffel verfahren. In Petrischalen wurden keine Kulturen angelegt nach den mit den Kartoffelscheiben gemachten ungünstigen Erfahrungen.

Nach 24 Stunden: Wachstum ist nicht eingetreten.
„ 48 „ „ „ „ „
„ 7 Tagen „ „ „ „

Auch eine zweite und dritte Impfung hatte keinen Erfolg.

Auf den Möhren ist kein Wachstum eingetreten, somit eignen sich diese für diesen Bacillus als Nährboden ebensowenig wie die Kartoffeln.

Schon aus den orientierenden Wachstumsversuchen hatte sich ergeben, daß einprozentiges Fleischwasserpepton dem Bacillus eine ausgezeichnete Nahrung bietet, während die stickstoffreie mineralische Nährlösung (M. - Nährlösung) mit Zusatz verschiedener Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen organischer und anorganischer Natur sich als Nährstoff weniger oder garnicht eignete. Von Interesse war es, welche Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen der Bacillus neben Fleischwasserpepton noch auszunutzen vermag. Zur Klärung dieser Frage wurden Nährlösungen von verschiedener Zusammensetzung hergestellt, von denen je 10 ccm in Reagenzgläsern gegeben und nach dem üblichen Sterilisieren mit je drei Ösen des gleichen Ausgangsmaterials geimpft wurden. Dasselbe stammte von drei Wochen alten Fleischwasserpepton-Agarkulturen. Die Beobachtungsdauer erstreckte sich für jede Versuchsreihe auf einen Zeitraum von zehn Tagen. Die Beobachtungsergebnisse wurden von 24 zu 24 Stunden festgelegt. Der Grad des Wachstums wurde beurteilt nach der Stärke der Trübung unter gleichzeitiger Berücksichtigung des Zeitpunktes beginnender Trübung. Aus der beigegebenen Tabelle ist die Zusammensetzung der Lösungen und das Wachstum zu ersehen. (Siehe Tabelle S. 28.)

Auch diese ernährungsphysiologischen Versuche zeigen deutlich, daß der Bacillus am besten Fleischextraktlösung in Verbindung mit Pepton oder Asparagin auszunutzen vermag. Er bedarf eines weiteren Zusatzes von Kohlenstoffverbindungen nicht. Die Versuchsergebnisse lassen im Gegenteil den Schluß zu, daß Galactose, Lactose und Gummi arabicum hemmend auf die Entwicklung wirken. Vollkommen oder fast vollkommen verschmähte der Bacillus die M.-Nährlösung mit Zusatz von Ammoniumnitrat, und auch in der M.-Nährlösung mit Asparagin war nur leidliches Wachstum festzustellen. Ein besseres Wachstum konnte durch die M.-Nährlösung mit Peptonzusatz erzielt werden, das aber nicht annähernd dem der Verbindung Fleischextrakt-Peptonlösung gleichkommt. Der Bacillus ist eingestellt auf hochwertige Eiweißverbindungen; stehen ihm diese nicht zur Verfügung, so hat er auch keinen Vorteil durch die Anwesenheit von Kohlehydraten. Er zieht seine Energie vorwiegend aus der Verarbeitung des Eiweißes.

Grundlösung	ohne Zusatz	mit Dextrose	mit Galactose	mit Saccharose	mit Lactose	mit Maltose	mit Raffinose	mit Xylose	mit Mannit	mit Stärke	mit Dextrin	mit Gummi arabicum	mit Glyzerin	mit Kaliumtartrat
1 % Fleischextraktlösung	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 % Fleischextraktlösung mit 0,5 % Pepton	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 % Fleischextraktlösung mit 0,5 % Asparagin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M. — Nährlösung mit 0,5 % Ammoniumnitrat	—	+	—	+	—	+	—	—	+	+	+	+	—	—
M. — Nährlösung mit 0,5 % Asparagin	+	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—
M. — Nährlösung mit 0,5 % Pepton	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

— kein Wachstum (keine Trübung)
+ geringes Wachstum (geringe Trübung)
++ gutes Wachstum (mittelstarke Trübung)
+ sehr gutes Wachstum (starke Trübung mit Bodensatz)

b) Versuche über Gärung und Säurebildung.

Gärung, bei der Gasbildung auftritt, verursacht der Bacillus nicht. Gärröhrchen wurden mit je 10 ccm einprozentiger Fleischextraktlösung, die vollständig klar war und zu der einprozentiger Traubenzucker, Rohrzucker, Milchzucker oder Malzzucker gegeben war, beschickt. Zwei Röhrchen enthielten einprozentige Fleischextraktlösung ohne weiteren Zusatz. Nach der üblichen Sterilisation wurden die sämtlichen Röhrchen auf das Vorhandensein von Luftblasen im geschlossenen Teil der Röhrchen geprüft und vorhandene entfernt. Nach der in der üblichen Weise vorgenommenen Impfung sämtlicher Röhrchen kamen sie in den Brutschrank. In allen Gärröhrchen war nach 24 Stunden Trübung der Lösung eingetreten, und zwar nur im offenen Schenkel. Gasblasen wurden nicht beobachtet, auch nicht an der Kuppe des geschlossenen Schenkels. In den folgenden Tagen verstärkte sich die Trübung in den Lösungen ganz wesentlich im offenen Teil der Röhrchen, während im geschlossenen nur ganz leichte Trübung festgestellt werden konnte. Gasblasen zeigten sich auch jetzt nicht, und nach zehn Tagen wurden keine weiteren Veränderungen in den Röhrchen beobachtet. Eine etwaige vollkommene Lösung des Gases in der Nährflüssigkeit kann der hohen Temperaturen wegen schwerlich in Frage kommen.

Gelegentlich der Aufgabe, die Verwertung der einzelnen kohlenstoff- und stickstoffhaltigen Nährstoffe durch den Bacillus zu prüfen, wurde gleichzeitig auch auf Säurebildung geachtet, da vielfach die Bildung organischer Säuren durch Bakterien zur Unterscheidung der Art herangezogen wird. Meine Beobachtungen erstrecken sich auf sämtliche Glieder der zweiten Versuchsreihe in der im Abschnitt „Ernährungsversuche“ aufgestellten Tabelle (einprozentige Fleischextraktlösung mit 0,5 Prozent Pepton als Grundlösung). Die sämtlichen Lösungen zeigten nach der Impfung neutrale Reaktion. Nach 24 Stunden war in allen Lösungen Trübung eingetreten, und nach vier Tagen ergab die Prüfung in den Lösungen, denen Traubenzucker, Rohrzucker, Mannit zugesetzt worden war, schwach saure Reaktion. In den übrigen Lösungen hat sich die Reaktion nicht geändert, auch nicht bis zum Abschluß des Versuches nach zehn Tagen; dagegen zeigten die erst genannten Lösungen nach Ablauf dieser Zeit stark saure Reaktion.

c) Versuche über Reduktion von Nitraten und Bildung von Ammoniak.

Nach LAFAR (1907) soll die Reduktion von Nitraten und die Bildung von Ammoniak eine nicht seltene Eigenschaft bei den Mikroorganismen sein und MISCHUSTIN (1926) berichtet, daß der amerikanische Forscher BERGEY, der eine ganze Reihe vonThermophilen studiert hat, bei allen die Fähigkeit zur Reduktion der Nitrate feststellte, und auch die von MISCHUSTIN selbst untersuchten Thermophilen taten dasselbe. Nach seiner Ansicht ist die physiologische Gruppe der Denitrifikatoren besonders reich in der thermophilen Flora vertreten. Ich habe daher auch den vorliegenden Bacillus daraufhin geprüft. Allerdings war es von vornherein schon zweifelhaft, daß er derartige Fähigkeiten besitzen könnte, da er ja, wie gezeigt wurde, stark sauerstoffbedürftig ist, eine Eigenschaft, die einer Denitrifikation nicht gerade günstig gegenüber steht, da er ferner nur hochwertige Eiweißstoffe verbraucht und es unwahrscheinlich war, daß er diese vollkommen bis zum Endprodukt Ammoniak abbaut. MISCHUSTIN sagt, daß die Denitrifikation bei hohen Temperaturen „eine Folge von Armut an Sauerstoff in erwärmten Lösungen ist und der Anpassungsreaktion der thermophilen Organismen entspricht".

Zur Prüfung wurden sterile Lösungen verschiedener Zusammensetzung herangezogen, und zwar 1. einprozentige Fleischextraktlösung mit Zusatz von 1 % Kalium- und Natriumnitrat, beide Nitrate in getrennten Lösungen, 2. stickstoffreie M.-Nährlösung mit 0,5 % Asparagin und getrennt 1 % Kalium- bzw. Natriumnitrat, 3. stickstoffreie M.-Nährlösung mit 0,5 % Pepton und 1 % Kalium- bzw. Natriumnitrat. Die in Gärröhrchen befindlichen Lösungen wurden nach dem Impfen (je drei Ösen) in den Brutschrank gebracht, ebenso die ungeimpft gebliebenen Röhrchen. Nach 24 Stunden zeigten sämtliche geimpfte Lösungen Trübung, die sich in allen Röhrchen in den folgenden Tagen noch verstärkte. Gasbildung konnte weder im offenen Teil noch an der Kuppe des geschlossenen Teiles der Röhrchen festgestellt werden. Auf Anwesenheit von Nitrit wurde nach dem Verfahren von JLOSVAY v. JLOSVA mit einer Lösung von Sulfanilsäure und α Naphthylamin in Essigsäure geprüft. In keiner der Nährlösungen trat nach dem Zusatz des Reagenz zu der gleichen Menge der Nährlösung Rotfärbung ein. Die Prüfung auf Ammoniak erfolgte mit dem Neßlerschen Reagenz und durch Merkuronitratpapier, soweit ersteres Prüfungsmittel sich nicht verwenden ließ. Der Bacillus vermag also

nicht, Nitrate zu Nitriten zu reduzieren oder Ammoniak zu bilden, wie bereits vermutet wurde. Nitrit und Ammoniak ließen sich nicht nachweisen. Sämtliche Lösungen, geimpfte und ungeimpfte zur Gegenkontrolle, wurden zehn Tage lang beobachtet und von 24 zu 24 Stunden die Prüfungen vorgenommen.

Enzymbildung.

Die Bakterien scheiden vielfach Stoffe aus, die imstande sind, unlösliche Stoffe in lösliche zu überführen und so für den Stoffwechsel zugänglich zu machen. Die Bildung von Enzymen ist bei Bakterien eine ganz verbreitete Eigenschaft, die insofern ein wertvolles diagnostisches Mittel sein kann, als bestimmten Bakterien in vielen Fällen ganz bestimmte Eigenschaften zukommen. Die Frage, ob auch der von mir isolierte Bacillus die Befähigung zur Bildung von Enzymen besitzt, wurde einer näheren Prüfung unterzogen. Berücksichtigt wurde die Bildung von: Gelatine verflüssigenden Enzymen, Koagulase, Amylase, Invertase und Zellulase. Die drei letzteren wurden gewählt, weil die Baumwollabfälle reich an Kohlehydraten sind, ja ihrem wesentlichen Bestandteil nach aus Zellulose sich zusammensetzen und es nicht ausgeschlossen war, daß der Bacillus die letztere angriffe.

a) Gelatine verflüssigendes Enzym.

Die Fähigkeit, Gelatine zu verflüssigen, ist im Bakterienreich recht häufig vertreten und dient als gutes Merkmal für die Bestimmung der Arten. Es wurde daher das Verhalten des Bacillus gegenüber Gelatine geprüft. In meinen früheren Versuchen wurde Gelatine, die sonst als Nährsubstanz sehr viel Verwendung findet, als für die höheren Temperaturen nicht geeignet ausgeschaltet. Da die Verflüssigung der Gelatine bei der herrschenden Brutschranktemperatur auch ohne Einwirkung eines Enzyms eintritt, mußte untersucht werden, ob nach Abschluß des Versuchs bei Zimmertemperatur die Verflüssigung bestehen bleibt oder der Nährboden wieder erstarrt. Der Nährlösung wurden 10 % bzw. 20 % Gelatine zugesetzt. Die schwach alkalisch gemachte, filtrierte, klare Nährgelatine wurde in der üblichen Weise sterilisiert und darauf in Röhrchen abgefüllt. Mehrere Röhrchen der zehn- und zwanzigprozentigen Nährgelatine wurden geimpft, einige blieben ungeimpft, sämtliche kamen in den Brutschrank. Da durch höhere Temperaturen nach Literaturangaben die Enzyme leicht geschädigt, unter Umständen ganz zerstört werden, wurden die Versuche bei

einer Brutschranktemperatur von 54° durchgeführt. Diese Temperatur wurde für die sämtlichen Enzymprüfungen beibehalten, sie liegt, wie bereits an früherer Stelle gezeigt worden ist, nahe dem Minimum des Wachstums.

Nach 24 Stunden: In sämtlichen Röhrchen mit geimpfter Nährgelatine ist starke Trübung im oberen Teil der Gelatine eingetreten. Beim leichten Bewegen fallen langsam dicke, schleimige Flocken zu Boden.

In der ungeimpften Nährgelatine ist keine Trübung festzustellen.

Nach drei Tagen: Zunahme der Trübung in den geimpften Röhrchen, die ungeimpften sind vollständig klar.

Nach zehn Tagen: Reichlicher Bodensatz, dagegen keine weitere Zunahme der Trübung. Der Inhalt der ungeimpften Röhrchen ist vollständig klar geblieben.

Sämtliche Röhrchen wurden nunmehr aus dem Brutschrank in Zimmertemperatur gebracht. Die Gelatine in allen Röhrchen wurde wieder gleichmäßig fest. Sonach vermag der Bacillus kein Enzym auszuscheiden, das Gelatine verflüssigt.

b) Koagulase.

Durch die Labenzyme (Koagulasen) wird bekanntlich Milch zur Gerinnung gebracht ohne gleichzeitige Säurebildung. Die Prüfung auf Anwesenheit von Koagulasen wird als unterscheidendes Merkmal sehr oft benützt und aus diesem Grunde auch zu den Versuchen herangezogen.

In mehrere sterile Reagenzgläser wurden je 10 ccm Milch gegeben und auf je 10 ccm drei Tropfen einprozentiger Calciumchloridlösung zugesetzt. Das geschah aus folgendem Grunde. Es wird angegeben, daß Milch, die mehrmals auf 100° erhitzt wird, sehr oft nicht mehr zum Gerinnen gebracht werden kann, eine Erscheinung, die durch Zugabe von geringen Mengen Calciumchlorid verhindert wird. Nachdem die Milch an drei aufeinander folgenden Tagen je 30 Minuten im Dampftopf sterilisiert worden war und 24 stündiges Halten derselben im Brutschrank Keimfreiheit gezeigt hatte, wurde, wie üblich, geimpft. Geimpfte und ungeimpfte Röhrchen kamen sodann in den Brutschrank.

Nach 24 Stunden: Makroskopisch war keine Veränderung der Milch zu erkennen; mikroskopisch konnte Wachstum in den geimpften Röhrchen festgestellt werden.

Nach 48 Stunden: Gleicher Befund.
„ 72 „ „ „

Nach 10 Tagen: Das makroskopische Bild war gegenüber dem Ergebnis nach 24 Stunden nicht verändert. Weder eine Säuerung, noch eine Gerinnung, noch eine Bräunung der Milch war festzustellen. Der Bacillus produziert somit keine Labenzyme.

c) Amylase.

Zur Prüfung auf Amylase wurden Nähragarröhrchen unter Zusatz von ein Prozent Stärke sterilisiert und in Petrischalen ausgegossen. Nach dem Erstarren des Agars wurde ein Teil der Platten in der üblichenWeise geimpft, der Rest der Platten blieb ungeimpft. Nach 24 stündigem Verweilen der Platten im Brutschrank zeigte es sich, daß in sämtlichen geimpften Platten Kolonien angegangen waren, während in den ungeimpften kein Wachstum zu beobachten war. Nach zehn Tagen konnte Zunahme des Wachstums festgestellt werden, während die ungeimpften Platten auch jetzt kein Wachstum zeigten. Im Umkreis der Kolonien wurden in dem durch die verflüssigte Stärke getrübten Agar keine helleren Stellen, wie sie nach LIESKE (1926) durch Verzuckern der Stärke entstehen sollen, wahrgenommen.

Weitere Versuche wurden mit Nährlösung, der ein Prozent Stärke zugesetzt worden war, angestellt. Nach Sterilisierung der Lösung wurde ein Teil der Röhrchen geimpft, ein Teil blieb ungeimpft; sämtliche kamen in den Brutschrank. Nach 24 Stunden war Wachstum in den geimpften Röhrchen eingetreten, das im Verlauf der weiteren Beobachtungstage noch wesentlich zugenommen hat. Eine Verzuckerung der Stärke war nicht nachzuweisen, weder die Fehling'sche Lösung wurde reduziert, noch trat beim Kochen mit Nylanders Reagens eine Reduktion ein.

d) Invertase.

Die Invertase ist bei den Mikroorganismen sehr verbreitet. Es war daher von Wichtigkeit zu sehen, ob auch der von mir isolierte Bacillus über sie verfügt, um so mehr, als Säurebildung bei Zusatz von Saccharose bereits bei den Ernährungsversuchen festgestellt worden war.

In verschiedene sterile Reagenzgläser wurde Nährlösung mit Zusatz von ein Prozent Rohrzucker gegeben und die Lösung sterilisiert. Nach Impfung eines Teiles der Röhrchen wurden geimpfte und ungeimpfte in den Brutschrank gestellt. Nach zehn Stunden

konnte bereits Trübung in den geimpften Röhrchen beobachtet werden. Die mit Fehling'scher Lösung und dem Nylander'schen Reagens auf Anwesenheit von Invertzucker vorgenommene Untersuchung hatte ein negatives Ergebnis. Auch bei den weiteren Prüfungen nach 14, 18 und 24 Stunden konnte Invertzucker nicht nachgewiesen werden. Da nun aber bei Zusatz von Saccharose zu dem Nährboden, wie oben erwähnt, Säure entsteht, der eine Verarbeitung des Rohrzuckers zugrunde liegen muß, so muß auch der Rohrzucker gespalten werden. Wenn trotzdem die Spaltungsprodukte nicht nachweisbar sind, so kann das nur darauf beruhen, daß sie sofort restlos in die Endprodukte verarbeitet werden. Ein direkter Nachweis der Invertase ist bis jetzt leider noch nicht möglich. Vielleicht ist auch die Invertase, soweit sie aus den abgestorbenen Bakterien in den Nährboden übergegangen ist, sofort durch die höhere Temperatur zerstört worden.

e) Zellulase.

Nach WERNER (1926) kann man verschiedene Arten von Zellulosezersetzungen durch Mikroorganismen unterscheiden, und zwar 1. durch aërobe, nicht gasbildende Bakterien, 2. durch denitrifizierende, gasbildende Bakterien, 3. durch anaërobe, gasbildende Bakterien, 4. durch thermophile Bakterien, 5. durch Schimmelpilze. Die Thermophilen sind teils aërob, teil anaërob und wirken bei sehr hohen Temperaturen (bis zu 65 °). Ihre Isolierung ist bisher nicht gelungen. Nach dieser Angabe mußte von Anfang an mit einem negativen Ausfall dieses Versuches gerechnet werden; diese Prüfung durfte jedoch nach meiner Ansicht entsprechend der bereits weiter oben geäußerten Vermutung nicht unterbleiben.

In mehrere sterile Petrischalen wurden Filtrierpapierscheiben gelegt, die mit Nährlösung getränkt worden waren. Nach Sterilisierung sämtlicher Platten wurde ein Teil in der bisherigen Weise geimpft, der Rest blieb ungeimpft. Nach 24 stündigem Verweilen der Platten im Brutschrank wurde erstmalig beobachtet. Auf dem geimpften Papier war geringes Wachstum eingetreten, das im Laufe der weiteren Beobachtungstage noch zunahm. Nach zehn Tagen ist am Papier mit Ausnahme des Wachstums von Kolonien keine Veränderung, am allerwenigsten eine beginnende Aufzehrung in unmittelbarer Nähe der Kolonien wahrzunehmen. Beim Bebrüten wurde dafür gesorgt, daß das Filtrierpapier stets mit der Nährflüssigkeit befeuchtet war. Nach 21 Tagen war das Bild dasselbe,

keine Veränderung am Papier der geimpften Platten; in den ungeimpften Kontrollplatten war kein Wachstum festzustellen.

Auch die weiteren, in abgeänderter Form durchgeführten Versuche hatten kein anderes Ergebnis. Bei diesen wurde in mehrere sterile Reagenzgläser Nährlösung gebracht, der ein Prozent Magnesiumkarbonat zur Neutralisation entstehender Säure zugesetzt war, und sodann in die Röhrchen Filtrierpapierstreifen soweit eingeschoben, daß sie eben die Flüssigkeitsoberfläche berührten. Nach dem Sterilisieren wurde ein Teil der Röhrchen geimpft, ein Teil blieb zur Kontrolle ungeimpft. Nach 24stündigem Aufenthalt der Röhrchen im Brutschrank war Trübung in allen geimpften Nährlösungen eingetreten, die noch weiter in den folgenden Tagen bedeutend zugenommen hatte. Die Papierstreifen zeigten nicht die geringste Veränderung. Auch nach zwanzig Tagen waren keinerlei Anzeichen vorhanden, die auf eine beginnende Veränderung des Papieres hätten schließen lassen. Die Nährflüssigkeit in den Kontrollröhrchen ist auch nach dieser Zeit vollständig klar geblieben. Ein Zellulose zersetzendes Enzym dürfte nach diesen Versuchergebnissen der Bacillus nicht bilden.

Die Ergebnisse der angestellten Versuche und Untersuchungen zeigen, daß in den Baumwollabfällen ein thermophiler Bacillus vorhanden ist, der unter ihm günstigen Bedingungen eine Selbsterhitzung feuchter Baumwollabfälle mitveranlassen kann ähnlich dem Bacillus calfactor, durch den in Verbindung mit anderen Mikroorganismen eine Erhitzung toten feuchten Heues erzielt werden kann. In seinen Eigenschaften weicht der von mir isolierte Bacillus jedoch ganz wesentlich vom Bacillus calfactor ab und auch von den näher beschriebenen thermophilen Formen BLAU's — Minimum derselben 40—45 ° —, so daß ich vorläufig den gefundenen Bacillus als eine bisher noch nicht beschriebene Form bezeichnen muß.

Eine kurze Gegenüberstellung der Eigenschaften des Bacillus calfactor und des neuen Bacillus in ihren Hauptmerkmalen sei hier gegeben.

Der Bacillus calfactor hat eine untere Temperaturgrenze von 30 °. Er versagt auf dem üblichen Fleischwasserpepton vollständig, bildet auf der Kartoffel dicke, schleimige, glänzende, gelbliche Massen. Die Stäbchen des Bacillus calfactor sind nie zu Ketten vereinigt, sondern fast alle einzeln, nur gelegentlich hängen noch zwei, seltener drei aneinander. Bei 70 ° wird nur

noch ein zarter Belag entwickelt und bei 74° findet während zweier Tage keine Entwicklung auf Agar mehr statt. Sporenbildung ist bei 70° nicht mehr festgestellt worden. Bis 80° bleibt die starke Beweglichkeit des Bacillus calfactor bestehen; bei 80° bleibt er noch zehn Minuten beweglich, bei 84° tritt momentaner Stillstand ein.

Der aus Baumwollabfällen isolierte Bacillus besitzt ein Temperaturminimum von 50—52°. Auf dem üblichen Fleischwasserpepton gedeiht er vorzüglich, dagegen tritt kein Wachstum auf der Kartoffel auch nach mehrmaligem Impfen auf. Die Stäbchen sind in bestimmten Stadien der Entwicklung zu Ketten, bestehend aus bis zu zehn Stäbchen, vereinigt. Bei 74° ist nach 24 Stunden ein Belag auf Agar vorhanden und auch noch Sporenbildung wahrzunehmen. Bei 92° ist noch lebhafte Beweglichkeit der Stäbchen zu beobachten, die auch nicht abnimmt bei längerem Belassen in dieser Temperatur. Der Bacillus geht demnach in seinem Wärmebedürfnis und in der Fähigkeit, höhere Temperaturen zu ertragen, nicht unbeträchtlich über Bacillus calfactor hinaus und zeigt auch hinsichtlich der Ernährungsbedingungen durchaus andere Ansprüche.

Eine Entwicklung des in Rede stehenden Bacillus ist nur möglich, wenn die Temperatur seines so hoch liegenden Minimums durch andere Mikroorganismen erzeugt wird. Es wird aber nur eine geringe Zahl thermophiler Organismen sein, welche die günstigen Vorbedingungen für ihn schaffen. Darum werden auch die Verhältnisse ungünstiger liegen wie beim Bacillus calfactor, dessen minimales Temperaturbedürfnis von 30° viel leichter gegeben sein wird, weil es unvergleichlich mehr Organismen gibt, die eine solche Temperatur erzeugen können, die ja schon in warmer Jahreszeit infolge Sonnenstrahlung entstehen kann. Es ist auch fraglich, ob es einzig und allein die Temperaturerhöhung ist, welche die Entwicklungsmöglichkeit bietet oder ob nicht etwa die bei niedrigen Wärmegraden sich entwickelnden Pilze und Bakterien den Nährboden erst geeignet machen. Es könnte immerhin möglich sein, daß die bei den hohen Wärmegraden absterbenden Pilze und Bakterien die Nahrung geben für die extremen Thermophilen. Ich hoffe, später darüber Aufschluß geben zu können.

Die Anregung zu vorliegender Arbeit erhielt ich von Herrn Privatdozenten Dr. phil. Reinhold Schaede. Es ist mir eine an-

genehme Pflicht, Herrn Dr. Schaede, der mir trotz der vielseitigen Inanspruchnahme stets in liebenswürdigster Weise mit seinem Rate zur Seite stand, meinen herzlichsten Dank auch an dieser Stelle auszusprechen.

Literatur.

BLAU, O., 1906. Über die Temperaturmaxima der Sporenkeimung und der Sporenbildung, sowie der supramaximalen Tötungszeiten der Sporen der Bakterien, auch derjenigen mit hohen Temperaturminima. Zentralbl. f. Bakt. II, **15,** S. 97. — **CATTERINA, G.,** 1904. Beitrag zum Studium der thermophilen Bakterien. Zentralbl. f. Bakt. II, **12,** S. 353. — **COHN, F.,** 1862. Über die Algen des Karlsbader Sprudels und deren Anteil an der Bildung des Sprudelsinters. Flora **45,** S. 538. — 1891. Über Wärmeerzeugung durch Schimmelpilze und Bakterien. 68. Jahresbericht der Schles. Gesellschaft f. vaterl. Kultur, Allgem. Bericht, S. 23. — 1893. Über thermogene Bakterien. Bericht d. Deutsch. Bot. Gesellsch. **11,** S. 66 des Generalversammlungsheftes. — **COOLEDGE, L.,** 1925. A probable explanation of high counts (pin point colonies) in pasteurized milk. Zentralbl. f. Bakt. II, **64,** S. 256. — **GLOBIG,** 1867. Über Bakterienwachstum bei 50—70°. Zeitschr. f. Hyg. **3,** S. 242. — **HARDING** and **WARD,** 1925. Thermophilic bacteria in composite samples from milk plants. Zentralbl. f. Bakt. II, **65,** S. 179. — **HOPPE-SEYLER,** 1875. Über die obere Temperaturgrenze des Lebens. Pflügers Archiv **11,** S. 113. — **HUNGERFORD** and **HARDING,** 1925. Influence of the period of operation of the pasteurizer upon the bacterial content of milk. Zentralbl. f. Bakt. II, **65,** S. 179. — **KARLINSKI,** 1896. Über thermophile Bakterien in Thermalquellen. Hyg. Rundschau **6,** S. 1904. — **KROHN VÄINÖ'** 1923. Studien über thermophile Schizomyceten. Annales Academ. Scientiar. Fennicae Ser. A, S. 125. — **DE KRUYFF, E.,** 1910. Les Bactéries thermophiles dans les Tropiques. Zentralbl. f. Bakt. II, **26,** S. 362. — **LAXA, O.,** 1898. Über einen thermophilen Bacillus aus Zuckerfabriksprodukten. Zentralbl. f. Bakt. II, **4,** S. 362. — **LIESKE, R.,** 1926. Allgemeine Bakterienkunde. — **MAC FAYDEN, A.** and **BLAXALL, R.,** 1899. Thermophilic bacteria. Transactions of the Jenner Institut of preventiv medicine London **2,** S. 162. — **MICHAELIS, G.,** 1899. Beiträge zur Kenntnis der thermophilen Bakterien. Archiv f. Hygiene **36,** S. 285. — **MIEHE, H.,** 1907. Die Selbsterhitzung des Heues. — **MIQUEL,** 1881. Bulletin de la statistique municipale de la ville de Paris decembre 1879. Annuaire de l'observatoire de Montsouris, S. 464. — **MISCHUSTIN, E.,** 1926. Untersuchungen über die Temperaturbedingungen für bakt. Prozesse im Boden in Verbindung mit der Anpassungsfähigkeit der Bakterien an das Klima. Zentralbl. f. Bakt. II, **66,** S. 328. — **MOLISCH, H.,** 1926. Pflanzenbiologie in Japan auf Grund eigener Beobachtungen. — **OPRESCU, O.,** 1898. Studien über thermophile Bakterien. Archiv f. Hyg. **33,** S. 164. — **RABINOWITSCH, L.,** 1895. Über die thermophilen Bakterien. Zeitschrift f. Hyg. und Inf.-Krankh. **20,** S. 154. — **SAMES, TH.,** 1900. Zur Kenntnis

der bei höherer Temperatur wachsenden Bakterien und Streptothrix-Arten. Zeitschrift f. Hyg. **33**, S. 313. — **SCHARDINGER, FR.**, 1903. Über thermophile Bakterien aus verschiedenen Speisen und Getränken usw. Zeitschr. f. Unters. der Nahrungs- und Genußmittel **6**, S. 865. — **SCHÜTZE, H.**, 1908. Beiträge zur Kenntnis der thermophilen Aktinomyceten und ihrer Sporenbildung. Archiv f. Hyg. **67**, S. 35. — **TANNER** and **HARDING**, 1926. Thermophilic Bacteria from milk. Zentralbl. f. Bakt. II, **67**, S. 330. — **TEICH**, 1896. Beitrag zur Kenntnis der thermophilen Bakterien. Hyg. Rundschau, S. 1094. — **VAN TIEGHEM, PH.**, 1881. Bulletin de la Société botanique de France. Janv. S. 35. — **TSIKLINSKY, P.**, 1899. Les microbes thermophiles des sources thermales. Annales de l'Institut Pasteur **13**, S. 500. — 1903. Sur la flore microbienne thermophile du canal intestinale de l'homme. Ebenda **17**, S. 216. — **WEBER, A.**, 1895. Die Bakterien der sog. sterilen Milch des Handels usw. Arbeiten d. Kaiserlichen Gesundheitsamtes **17**, S. 108. — **WERNER, E.**, 1926. Die Erreger der Zelluloseverdauung bei der Rosenkäferlarve. Zentralbl. f. Bakt. II, **67**, S. 297.

Lebenslauf.

Geboren am 14. September 1881 zu Glonn, Oberbayern, widmete ich mich nach dem Besuch der Realschule und des Gymnasiums in Rosenheim dem pharmazeutischen Beruf. Nach Abschluß der vorgeschriebenen praktischen Ausbildung besuchte ich vier Semester die Universität Erlangen, die ich nach bestandener pharmazeutischer Prüfung verließ. An den Universitäten Bonn und München setzte ich dann die naturwissenschaftlichen bzw. nahrungsmittelchemischen Studien fort. Im Dezember 1910 bestand ich die Hauptprüfung als Nahrungsmittelchemiker in München. Nach mehrjähriger Tätigkeit als Hilfsarbeiter an Nahrungsmitteluntersuchungsanstalten und als Stabsapotheker in Nürnberg, München und im Felde, wurde ich zum Regierungsapotheker der Reichswehr in Breslau ernannt. Im Wintersemester 1925/26 nahm ich an der Schlesischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Breslau erneut meine Studien auf, aus denen diese Dissertation hervorgegangen ist.